

"مقاله پژوهشی"

اثرات تکنیک توده زیستی (Biofloc) بر برخی شاخص‌های خونی و ایمنی فیل ماهی (*Huso huso*) جوان پرورشی

محمود آقابراری^۱، سورنا ابدالی^۱، ایوب یوسفی جوردی^{۲*}

۱- گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۳/۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۶

چکیده

بایوفلاک به عنوان یک فیلتر بیولوژیکی عمل می‌کند و محیط مناسبی برای باکتری‌هایی است که می‌توانند آمونیاک موجود در آن را حذف کنند. تحقیق حاضر به منظور تعیین اثر سیستم بایوفلاک بر برخی شاخص‌های خونی و ایمنی فیل ماهی جوان پرورشی طی ۸ هفته انجام شد. بدین منظور، ۱۲۰ فیل ماهی با وزن اولیه $2/9 \pm 168/2$ گرم در ۶ مخزن فایبر گلاس ۲۰۰۰ لیتری معرفی شدند. تیمارها شامل تیمار شاهد و یک تیمار بایوفلاک و هر تیمار با ۳ تکرار بود. بر اساس نتایج، بین تیمارها از نظر NO_2 ، NO_3 ، NH_3 ، NH_4 ، TAN و تعداد کل باکتری اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($p < 0/05$). بطوریکه کمترین مقادیر pH، NO_3 ، NH_3 ، NH_4 و TAN در تیمار ۱ (سیستم بایوفلاک) بود. شاخص‌های شوری، نسبت نیتروژن به فسفر، قلیائیت و ارتوفسفات بین دو تیمار اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($p > 0/05$). ولی میزان کل جامدات معلق (TDS) در تیمار بایوفلاک به طور معنی‌داری بیشتر از شاهد بود ($p < 0/05$). بر اساس نتایج حاصل، تعداد گلبول‌های قرمز و گلبول سفید، نوتروفیل، درصد هماتوکریت و MCV در تیمار بایوفلاک بطور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد بود ($p < 0/05$). نتایج شاخص‌های ایمنی نشان داد که سطوح ایمونوگلوبولین M، لیزوزیم و ایمونوگلوبولین کل در تیمار بایوفلاک نسبت به شاهد بهبود یافت، ولی معنی‌دار نبود ($p > 0/05$). علاوه بر این، تیمار بایوفلاک بطور معنی‌داری تعداد باکتری بیشتری نسبت به شاهد داشت ($p < 0/05$). بطور کلی، سیستم بایوفلاک باعث بهبود شرایط فیزیولوژیک فیل ماهی جوان در مقایسه با شاهد گردید و بکارگیری آن در سیستم‌های پرورشی توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: بایوفلاک، شاخص‌های خونی، ایمنی، فیل ماهی.

* عهده‌دار مکاتبات: Ayoub2222002@yahoo.com

مقدمه

تأمین نیاز بشر به آبریان با بیش از هفت میلیارد جمعیت، تنها با افزایش تولیدات در صنعت آبرزی پروری امکان پذیر است. بنابراین، توسعه و متراکم سازی پرورش آبریان امری حیاتی و اجتناب ناپذیر در صنعت آبرزی- پروری دنیاست. بدون شک مهم ترین موضوع در توسعه آبرزی پروری تولید حداکثری آبریان بدون استفاده بیشتر از منابع آب و زمین است. توسعه پایدار آبرزی پروری به گونه ای که دستخوش تغییرات و آسیب های جبران ناپذیر نشود، ضرورت دوم در این زمینه محسوب می شود. سومین ضرورت اجرای این تحقیق به کارگیری سیستم های نوین و مطرح در زمینه آبرزی پروری از قبیل سیستم بایوفلاک می باشد که نسبت هزینه به فایده را در بعد اقتصادی و اجتماعی بطور همزمان فراهم نماید (Avnimelech, 2007). استفاده از فناوری بایوفلاک برای پرورش گونه هایی که با شرایط محیطی سازگارتر هستند، با موفقیت بیشتری همراه می باشد (Souza et al., 2014). فناوری بایوفلاک حاصل توسعه استخرهایی است که آب آنها مداوم هوادهی می شود و اختلاط پیدا می کند که عدم تعویض آب یا حداقل تعویض آب مد نظر می باشد. گرایش به کاهش تعویض آب و ضرورت آن عاملی شد تا فناوری بایوفلاک در اوایل دهه ۲۰۰۰ مورد بررسی قرار گیرد. در گذشته، نرخ بالای تعویض آب از روش های اصلی کنترل کیفیت آب و تولید در مزارع نیمه متراکم و متراکم ماهی و میگو بشمار می رفت. در آن زمان آب به شکل روزانه و اغلب با نرخ بسیار بالا تعویض می شد. در صورت عدم مطلوبیت کیفیت آب، تعویض و جایگزینی آن با آب تمیز انجام می گرفت. اما به دلایل مختلفی از قبیل گرانی و کمپایی آب شیرین، رهاسازی

آب تصفیه نشده استخر به محیط زیست، شیوع بیماری های ویروسی و غیره به بن بست رسید. افزایش غلظت ترکیبات نیتروژن دار آب فرآیندی است که در همه سامانه های آبرزی پروری رخ می دهد. شدت این فرآیند با افزایش زیاده و غذادهی افزایش می یابد. نیتريت (NO_2) و آمونیاک (NH_3) هر دو سمی اند و می توانند بر رشد، سلامت و حیات ماهی شدیداً تاثیر گذار باشند. روش های حذف این مواد نیتروژن دار با تبدیل آنها به اشکال غیر سمی از ضروریات سامانه های متراکم است (Avnimelech et al., 2009).

سیستم بایوفلاک که در حال حاضر یکی از فناوری های مطرح در صنعت به خصوص پرورش ماهی به شمار می رود، می تواند یاریگر توسعه صنعت آبرزی- پروری با شرایط مذکور باشد. بایوفلاک ها با حفظ کیفیت آب باعث کاهش نیاز به تعویض آب و از طریق تولید پروتئین میکروبی قابل مصرف منجر به کاهش ضریب تبدیل غذایی میگوی پرورشی می شوند (عبدی راد و قانندینا، ۱۳۹۵). پایه و اساس سامانه های فناوری بایوفلاک را بایوفلاک ها، مواد پوده ای، ذرات آلی مرده، میکروب ها، جلبک ها، پروتوزواها و دیگر موجودات تشکیل می دهند. سیستم بایوفلاک به ذرات میکروسکوپی متشکل از باکتری ها، دیاتومه ها و جلبک ها، ذرات غذایی و ارگانسیم های مرده گفته می شود. تکنولوژی Biofloc (BFT) به عنوان "انقلاب آبی" جدید در حوزه آبرزی پروری شناخته می شود. زیرا مواد مغذی می تواند به طور مداوم بازیافت شوند. استفاده مجدد در محیط کشت، با استفاده از حداقل یا تبادل صفر آب به دست آمد. چنین تکنیکی سازگار با محیط زیست بر مبنای تولید میکروارگانسیم است که سه نقش اصلی را بازی می کند (۱): حفظ کیفیت آب،

محافظت از میگوی آب شور (*Artemia franciscana*) در برابر *Vibrio harveyi* و غیره اشاره نمود. بنابراین، تحقیق حاضر با هدف تعیین اثر سیستم بایوفلاک بر شاخص‌های خونی و ایمنی در فیل ماهی انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی سیستم پرورش و تهیه ماهی

این تحقیق در ۶ مخزن فایبرگلاس ۲۰۰۰ لیتری در سالی سرپوشیده با استفاده از آب چاه در مؤسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر با دوره پرورش به مدت ۸ هفته در سال ۱۳۹۸ انجام شد. ۱۲۰ فیل ماهی جوان با میانگین وزنی $2/9 \pm 168/2$ گرمی و طولی اولیه $0/41 \pm 35/2$ سانتی‌متر و با تراکم ۲۰ ماهی در هر مخزن (تکرار) توزیع شدند. هر یک از مخازن دارای سیستم هوادهی بوده و توسط آب چاه (دمای آب ۱۷ درجه سانتی‌گراد) با دبی ۳ لیتر در دقیقه آبرسانی شدند. جهت انجام این تحقیق ۱ تیمار شامل سیستم بایوفلاک و ۱ شاهد (روش معمولی) در نظر گرفته شد (Long et al., 2015). قبل از شروع آزمایش، ماهیان به مدت یک هفته با جیره غذایی پایه حاوی ۴۶ درصد پروتئین، ۲۰ درصد کربوهیدرات، ۱۵ درصد چربی و ۱۹ مگاژول انرژی به منظور سازگاری تغذیه شدند (Yousefi Jourdehi et al., 2014). مقدار غذای مورد نیاز با استفاده از ترازوی دیجیتالی مدل AND Gf – 300 ساخت ژاپن وزن شده و با توجه به تیمارهای مورد نظر به ماهیان تغذیه شد. غذادهی با جیره غذایی دست‌ساز به ماهیان در حدود ۳ درصد وزن بدن و بصورت دستی در ۴ وعده انجام شد (Sener و همکاران، ۲۰۰۶).

با جذب ترکیبات نیتروژن تولید شده؛ (۲) تغذیه، افزایش قابلیت‌های کشت با کاهش ضریب تبدیل خوراک (FCR) و کاهش هزینه‌های خوراک؛ و (۳) رقابت با پاتوژن‌ها و نیز تصحیح نسبت کربن به نیتروژن در محیط کشت. همچنین رویکرد پایدار چنین سیستمی مبتنی بر تولید بالای ماهی/میگو در سطح کوچک است. علاوه بر این، توده زیستی (Biofloc) منبع غنی از پروتئین و چربی طبیعی مواد غذایی موجود در آب است که ۲۴ ساعت در روز به علت تعامل پیچیده بین مواد آلی، بستر فیزیکی و طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها در دسترس می‌باشد. این بهره‌وری طبیعی نقش مهمی در چرخش مواد مغذی و حفظ کیفیت آب بازی می‌کند. استفاده از بایوفلاک با ماهی یا میگو مزایای فراوانی از قبیل بهبود نرخ رشد، کاهش FCR و نیز کاهش هزینه‌های مربوط به خوراک دارد (Avnimelech, 2015).

از جمله مطالعات انجام‌شده در خصوص اثر بایوفلاک بر آبریان می‌توان به مطالعات خانجانی و همکاران (۱۳۹۵)، روی تولید و ارزیابی بایوفلاک به منظور بکارگیری در سیستم‌های بدون تعویض آب، حق‌پرست رادمرد و همکاران (۱۳۹۷)، روی اثر نسبت‌های مختلف کربن- نیتروژن در سیستم پرورش متراکم بایوفلاک بر شاخص‌های رشد و سلامت ماهی کپور معمولی، خانجانی (۱۳۹۸)، روی کاربرد فناوری توده‌ساز زیستی (بایوفلاک) در آبی‌پروری با تأکید بر ماهیان زینتی، بخشی و همکاران (۱۳۹۵ و ۱۳۹۳)، روی بازدهی استفاده از سیستم تولید توده زیستی در پرورش متراکم ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، و در خارج از کشور نیز می‌توان به مطالعات Crab و همکاران (۲۰۱۰)، روی کاربرد فناوری بایوفلاک برای

آماده سازی سیستم بایوفلاک

برای ایجاد سیستم بایوفلاک از روش مستقیم استفاده شد. پس از تهیه باکتری های مورد نظر (نیتروزوموناس، نیتروزوکوکوس، نیتروزوپیرا، نیتروبولوس و نیتروزوبیرئو) و ترکیب آنها با یکدیگر و مخلوط نمودن آنها با آب محیط پرورش سوش های باکتریایی مورد نظر تهیه گردید و سپس به محیط آب پرورش افزوده گردید (Avnimelech, 2009). بطوریکه، با افزودن باکتریهای نیتروباکتر به مخزن پرورش و نیتروژن وارد شده به آب از طریق غذا و مدفوع به عنوان منبع نیتروژن و با افزودن کربن مورد نیاز به آب، توده بایوفلاک در همان مخزن پرورشی تشکیل شد (رضایی و رفیعی، ۱۳۹۷). از منبع کربوهیدراتی آرد گندم جهت افزایش نسبت کربن به نیتروژن (۱۵ به ۱) (خانجانی و همکاران، ۱۳۹۴) و نیز تقویت جذب نیتروژن توسط باکتریها استفاده شد (Avnimelech, 2012). مدت زمان تشکیل توده بایوفلاک در دمای ۱۷ درجه سانتی-گراد ۱۸ روز بطول انجامید. برای اندازه گیری تقریبی مواد جامد معلق از قیف های مدرجی بنام ایمفوف و استوانه مدرج استفاده شد (عبدی راد و قائدینا، ۱۳۹۴). مخازن پرورش مجهز به سیستم هوادهی و بدون تعویض آب بود.

اندازه گیری پارامترهای فیزیکی و شیمیایی

در طی تحقیق بعضی از پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب از قبیل دمای آب و اکسیژن محلول با استفاده از اکسیژن متر مدل HACH ساخت آمریکا، pH آب با استفاده از pH متر مدل ۸۲۷ متروم ساخت سوئیس، TDS با استفاده از TDS-3 متر مدل HM

ساخت چین، به صورت روزانه مورد سنجش قرار گرفت. مواد جامد معلق کل (TSS) و تقاضای اکسیژن بیوشیمیایی (BOD) آب براساس روش استرلینگ (Stirling) و غلظت نیتروژن آمونیاکی کل (TAN)، نیتريت (NO_2)، نیترات (NO_3)، ارتوفسفات (PO_4)، قلیائیت و کدورت آب با استفاده از دستگاه پالین تست فتومتر ۷۵۰۰ ساخت انگلستان اندازه گیری شد (Suantika و همکاران، ۲۰۱۶؛ خانجانی و همکاران، ۱۳۹۵). آمونیوم، نیتريت و نیترات برای پارامترهای شیمیایی هر روز به ترتیب با استفاده از روش Nessler، دیازوتیزه و Nitrate HCl اندازه گیری شد (Ahn و همکاران، ۲۰۰۵).

خونگیری و سنجش شاخص های خونی

در انتهای دوره، ۲۴ ساعت پس از قطع غذا، خونگیری از ماهیان از سیاهرگ دمی با استفاده از سرنگ ۲ سی سی صورت پذیرفت. ۰/۵ سی سی خون درون تیوب های اپندروف حاوی هپارین برای تعیین شاخص های خونی ریخته شد (Torrecillas و همکاران، ۲۰۱۱). جداسازی سرم از سلول های خونی با استفاده از سانتریفوژ (مدل Labofuge 200، ساخت شرکت Sepatech Heraeus آلمان)، با سرعت ۳۰۰۰ دور در مدت زمان ۱۰ دقیقه انجام شد. سرم با استفاده از میکروسپلر جدا شد و به ویال انتقال یافت (Pottinger and Carrik, 2001). گلبول های قرمز و سفید با استفاده از محلول Rees و با ملانژور و لام نئوبار شمارش شدند (کاظمی و همکاران، ۱۳۸۹). سنجش هموگلوبین با استفاده از روش سیان مت هموگلوبین و به وسیله اسپکتروفتومتر (مدل 2100-VIS ساخت شرکت Unico آمریکا) با طول موج ۵۴۰ نانومتر انجام شد

(Klontz, 1994). از لوله‌های میکروهماتوکریت و یک میکروسانتریفیوژ Hettich با دور ۷۰۰۰ rpm در مدت ۵ دقیقه برای سنجش هماتوکریت استفاده شد. میزان MCV، MCH و MCHC با استفاده از روابط زیر محاسبه گردید (Houston, ۱۹۹۰):

$$\text{MCV (میلیون)} = \text{RBC} / 10 \times \text{هماتوکریت}$$

$$\text{MCH (میلیون)} = \text{RBC} / 10 \times \text{هموگلوبین}$$

$$\text{MCHC} = 100 \times \text{هماتوکریت} / \text{هموگلوبین}$$

برای رنگ آمیزی گلبول‌های سفید از متانول ۹۶٪ و محلول ۱۰٪ گیمنسا (ساخت شرکت Merck آلمان) استفاده شد و شمارش انواع گلبول‌های سفید نظیر نوتروفیل‌ها، لنفوسیت‌ها، مونوسیت‌ها و ائوزینوفیل‌ها به روش زیگزاک صورت پذیرفت (عامری مهابادی، ۱۳۸۷).

سنجش شاخص‌های ایمنی

روش مورد استفاده برای اندازه‌گیری ایمنوگلوبولین M روش ایمنوتوربیدی متری Immuno turbidimetric است. در این روش IgM با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال موجود در محلول‌های تامپون تشکیل کمپلکس داده و باعث کدر شدن محلول می‌شوند. شدت کدورت ایجاد شده با مقدار IgM رابطه مستقیم داشته و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل 2100-VIS ساخت شرکت Unico آمریکا) در طول موج ۳۴۰ نانومتر با بلانک (آب مقطر) خوانده می‌شود (Khoshbavar-Rostami et al., 2006). برای اندازه‌گیری سطوح لیزوزیم در سرم خون، ۱/۷۵ میلی‌لیتر از *Micrococcus lysodeikticus* (سیگما) (معادل مقدار ۰/۳۷۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از بافر فسفات سدیم ۰/۰۵ مولار با pH برابر ۶/۲) با ۲۵۰

میکرولیتر از نمونه‌های سرم مخلوط و جذب نوری پس از ۱۵ و ۱۸۰ ثانیه به روش طیف سنجی و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۷۰ نانومتر قرائت می‌شود. بافر فسفات سدیم به عنوان بلانک استفاده می‌شود (Ellis, 1990). غلظت ایمنوگلوبولین کل مطابق با روش شرح داده شده توسط Siwicki و Anderson (۱۹۹۳) و Okamoto, Satoh, Kiron, Amar و Watanabe (۲۰۰۰) اندازه‌گیری شد. مقدار ایمنوگلوبولین بصورت (میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر) بیان شد.

تجزیه و تحلیل آماری

این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. نرمال بودن داده‌ها با آزمون شاپیرو-ویلک تست گردید. برای مقایسه میانگین داده‌ها بین تیمارها از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و برای جداسازی گروه‌های همگن از آزمون توکی در سطح احتمال ۵٪ استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل و تحلیل کلیه داده‌ها از نرم‌افزار SPSS ۲۲ استفاده گردید.

نتایج

پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب

با توجه به آزمون توکی و آنالیز واریانس یک‌طرفه بین تیمارها از نظر دمای آب اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0/05$). با توجه به آزمون من-ویتنی و کروسکال-والیس بین تیمارها از نظر pH و اکسیژن محلول اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0/05$). با توجه به آزمون توکی و آنالیز واریانس یک‌طرفه بین تیمارها از نظر NH_4 ، NH_3 ، NO_3 ، NO_2 و

TAN اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($p < 0/05$). کمترین مقادیر pH و کمترین مقادیر NH_3 ، NO_3 و NH_4 در تیمار ۱ (سیستم بایوفلاک) مشاهده گردید. با توجه به کروسکال - والیس بین تیمارها شاخص‌های شوری، نسبت نیتروژن به فسفر، قلیائیت و

ارتوفسفات بین دو تیمار اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($p > 0/05$). ولی میزان کل جامدات معلق (TDS) در تیمار بایوفلاک به طور معنی‌داری بیشتر از شاهد بود ($p < 0/05$) (جدول ۱).

جدول ۱: نتایج پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب در تیمار بایوفلاک و شاهد

شاخص‌ها	تیمارها	سیستم بایوفلاک	شاهد
دمای آب (درجه سانتی‌گراد)		$18/47 \pm 0/15^a$	$18/50 \pm 0/2^a$
اکسیژن محلول (میلی گرم در لیتر)		$8/2 \pm 0/2^b$	$7/90 \pm 0/01^a$
pH		$7/60 \pm 0/12^a$	$7/80 \pm 0/09^a$
نترات (ppm , NO_3)		$0/0076 \pm 0/0011^b$	$0/0184 \pm 0/00085^a$
نیتريت (ppm , NO_2)		$0/004 \pm 0/0021^b$	$0/007 \pm 0/002^a$
آمونیاک (ppm , NH_3)		$0/0060 \pm 0/0036^b$	$0/0154 \pm 0/0002^a$
آمونوم (ppm , NH_4)		$0/2133 \pm 0/0025^b$	$0/2458 \pm 0/0016^a$
کل آمونیاک نیتروژنی (ppm , TAN)		$0/217 \pm 0/021^b$	$0/263 \pm 0/015^a$
شوری (ppt)		$0/22 \pm 0/001^a$	$0/20 \pm 0/001^a$
کل جامدات معلق (mg/l , TDS)		60 ± 35^b	550 ± 30^a
نسبت نیتروژن به فسفر		$1:0/001^a$	$1:0/003^a$
قلیائیت (آلکالیتی، mg/l)		$192/3 \pm 15/1^a$	$13/17 \pm 6/75^a$
ارتوفسفات (mg/l)		$0/576 \pm 0/003^b$	$0/771 \pm 0/064^a$

حروف لاتین غیر مشترک در هر ردیف، نشان‌دهنده اختلاف بین تیمارها است ($p < 0/05$).

شاخص‌های خونی

بر اساس نتایج حاصل، میزان هموگلوبین، MCH، MCHC، اختلاف معنی‌داری بین تیمارها نشان نداد ($p > 0/05$). تعداد گلبول‌های سفید، تعداد گلبول‌های قرمز، هماتوکریت، MCV، اختلاف معنی‌داری بین تیمارها نشان داد ($p < 0/05$). درصد مونوسیت و ائوزینوفیل اختلاف معنی‌داری بین تیمارها نداشت ($p > 0/05$). در حالیکه درصد نوتروفیل و لنفوسیت اختلاف معنی‌داری بین تیمارها نشان داد ($p < 0/05$). بطوریکه کمترین تعداد گلبول سفید و نوتروفیل و

بیشترین تعداد گلبول قرمز، هماتوکریت، MCV و لنفوسیت در تیمار ۱ (سیستم بایوفلاک) مشاهده گردید (جدول ۲).

شاخص‌های ایمنی

نتایج آنالیز شاخص‌های ایمنی نشان داد که سطوح ایمونوگلوبولین M، لیزوزیم و ایمونوگلوبولین کل در تیمار بایوفلاک نسبت به شاهد بهبود یافت، ولی معنی‌دار نبود ($p > 0/05$) (جدول ۳).

جدول ۲: نتایج شاخص‌های خونی در تیمارهای مختلف در فیل ماهی طی ۸ هفته پرورش

شاخص‌ها	تیمارها	
	سیستم بایوفلاک	شاهد
تعداد گلبول سفید (تعداد در هر میلی‌متر مکعب)	$6500 \pm 458/26^b$	$7800/67 \pm 450/92^a$
تعداد گلبول قرمز (عدد در میلی‌متر مکعب $\times 10^5$)	$6/9 \pm 0/58^b$	$6/3 \pm 0/5^a$
هموگلوبین (گرم/دسی لیتر)	$6/10 \pm 0/15^a$	$5/83 \pm 0/12^a$
هماتوکریت (%)	$24/6 \pm 1/53^b$	22 ± 1^a
MCV (فیمتولیترا)	$340/67 \pm 10/01^b$	$331/20 \pm 6/11^a$
MCH (پیکوگرم)	$85/33 \pm 1/53^a$	$90/1 \pm 1^a$
MCHC (%)	$25/47 \pm 0/25^a$	$28/80 \pm 0/35^a$
نوتروفیل (%)	$11/67 \pm 1/51^b$	$15/33 \pm 0/58^a$
لنفوسیت (%)	$85 \pm 1/73^b$	$78 \pm 1/73^a$
مونوسیت (%)	$4/33 \pm 1/16^a$	5 ± 1^a
ائوزینوفیل (%)	$1 \pm 0/72^a$	$0/87 \pm 0/58^a$

حروف لاتین غیر مشترک در هر ردیف، نشان‌دهنده اختلاف بین تیمارها است ($p < 0/05$).

جدول ۳: نتایج شاخص‌های ایمنی در تیمارهای مختلف در فیل ماهی طی ۸ هفته پرورش

تیمار	شاخص	
	بایوفلاک	شاهد
IgM (میلی گرم/دسی لیتر)	$81/4 \pm 7/12^a$	$76/22 \pm 1/51^a$
لیزوزیم (u/ml/min)	$39 \pm 7/81^a$	34 ± 1^a
ایمونوگلوبولین کل (میلی گرم/میلی لیتر)	$13/61 \pm 0/68^a$	$12/93 \pm 0/31^a$

حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($p > 0/05$).

بحث

پاسخ ایمنی در گونه‌های مختلف ماهیان بر اساس شرایط زیستی و واکنش فیزیولوژیک بدن متفاوت است (صابری و همکاران، ۱۴۰۱). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تعداد گلبول‌های قرمز و گلبول سفید، نوتروفیل، درصد هماتوکریت و MCV در تیمار بایوفلاک بطور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد بود. تعیین مقدار هموگلوبین، درصد هماتوکریت و تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) برای به‌دست آوردن اندیکس-های گلبول قرمز و پی بردن به وضعیت خون‌سازی ماهی ضروری است (شکوری و همکاران، ۱۳۹۲).

نتایج شاخص‌های ایمنی نشان داد که سطوح ایمونوگلوبولین M، لیزوزیم و ایمونوگلوبولین کل در تیمار بایوفلاک نسبت به شاهد بهبود یافت، ولی معنی-دار نبود. علاوه بر این، تیمار بایوفلاک تعداد باکتری بیشتری نسبت به شاهد داشت و از اختلاف معنی‌داری برخوردار بود. زمانی که ماهیانی در شرایط بایوفلاک قرار می‌گیرند ممکن است دچار کمبود اکسیژن شود. برای جبران استرس ناشی از هیپوکسی خون، میزان هموگلوبین و هماتوکریت جهت افزایش اکسیژن‌رسانی به اندامهای حیاتی بدن نیز بیشتر می‌شود. از نظر فیزیولوژیکی افزایش هماتوکریت حین استرس ممکن

افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی، رشد، تکثیر و پاسخ ایمنی را به همراه دارد.

صابری و همکاران (۱۴۰۱)، اثر هیپوکسی حاد و مزمن بر سیستم ایمنی و آنتی اکسیدانی ماهی کپور معمولی در سیستم بیوفلاک را مورد مطالعه قرار دادند و بیان داشتند استرس هیپوکسی حاد و مزمن سبب تضعیف پارامترهای خونی ماهی کپور معمولی در سیستم بیوفلاک گردید. طرفی و همکاران (۱۴۰۱)، اثر سیستم بیوفلاک بر شاخص های رشد، ترکیب بدن و آنزیم های گوارشی در ماهی کپور معمولی جوان را مورد مطالعه قرار دادند و دریافتند فعالیت آنزیم های لیپاز، آمیلاز و آلکالین فسفاتاز در سیستم بیوفلاک در مقایسه با شاهد اختلاف معنی داری نداشت. همچنین بیان داشتند سیستم بیوفلاک ضمن کاهش بار آلودگی نیتريت و آمونیاك آب محیط پرورش، میزان مصرف پروتئين جیره را نیز کاهش داد.

استفاده از سیستم بیوفلاک در ماهی روهو باعث افزایش رشد قابل توجه این ماهی نسبت به تیمار شاهد شد (Kamiliya و همکاران، ۲۰۱۷). Avnimelech (۱۹۹۹)، بیان کرد که بیوفلاک می تواند نیاز به پروتئين و مواد مغذی دیگر را برای تیلپای موزامبیک برطرف نماید. Mahanand و همکاران (۲۰۱۳)، با بررسی بچه- ماهیان روهو (*Labeo rohita*) بیان کردند که ماهیانی که در سیستم بیوفلاک پرورش یافتند، از میانگین وزن نهایی و نرخ رشد ویژه بالاتری در مقایسه با تیمار شاهد برخوردار بودند. اما دارای ضریب تبدیل غذایی و نرخ عملکرد پروتئين پایین تری نسبت به تیمار شاهد بودند و به این نتیجه رسیدند که سیستم بیوفلاک جهت پرورش ماهی روهو مناسب است. این نتیجه نشان دهنده این موضوع می باشد که نوع غذا و رژیم غذایی و گونه

است به دلیل کاهش حجم پلاسما، متورم شدن گلبولهای قرمز یا رها شدن مقادیر بیشتری گلبول قرمز از بافت های خونساز به درون خون باشد (Swift, 1982).

Long و همکاران (۲۰۱۵)، اثر تکنولوژی بیوفلاک بر رشد، فعالیت آنزیم گوارشی، خونشناسی و پاسخ ایمنی تیلپای نیل (*Oreochromis niloticus*) پرورشی بهبود یافته از نظر ژنتیکی را مورد مطالعه قرار دادند و بیان داشتند اختلاف معنی داری در شاخص های خونی در سیستم بیوفلاک وجود نداشت. اما سبب بهبود پاسخ ایمنی در تیلپای پرورشی شد. بیوفلاک نه تنها مواد مغذی اضافی از قبیل پروتئين ها، چربی ها، مواد معدنی و ویتامین ها هستند (Xu et al., 2012a)، بلکه میکروب های طبیعی زیاد و ترکیبات زیستی فعالی از قبیل کارتنوئیدها و ویتامین های محلول در چربی (Ju et al., 2008) و ترکیبات محرک ایمنی دیگری (Crab et al., 2012) که ممکن است پاسخ ایمنی ماهی پرورشی را افزایش دهد، را فراهم می کنند. بعلاوه، بیوفلاک نقش مثبتی در مصرف غذا و فعالیت آنزیم- های گوارشی ماهی بازی می کند (Xu et al., 2012b) که ممکن است جذب مواد زیست فعال جیره از غذا را افزایش داده، و سبب تحریک سیستم ایمنی ماهی پرورش یافته در سیستم بیوفلاک شود (Long et al., 2015). Emerenciano و همکاران (۲۰۱۳)، بیان داشتند که تکنولوژی بیوفلاک امکان تولید تخم های با کیفیت مطلوب از طریق بهبود عملکرد تولیدمثل موجودات آبرزی و نیز افزایش ایمنی لاروها را فراهم می سازد. Crab و همکاران (۲۰۱۰) ابراز نمودند که بیوفلاک ها حاوی مواد معدنی ریز و ویتامین C می- باشند که اثرات مثبتی بر موجودات آبرزی از جمله

عملکرد رشد و بازماندگی پست لارو میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) را مورد مطالعه قرار دادند و بیان داشتند که کیفیت آب و برخی شاخص‌های رشد بهبود یافت. سطوح آمونیاک و نیتريت کاهش، و میزان کل مواد جامد معلق افزایش یافت.

خانجانی و همکاران (۱۳۹۵)، با بکارگیری سیستم بایوفلاک در سیستم‌های پرورش میگوی سفید غربی بیان کردند که به وسیله سیستم بدون تعویض آب و اضافه کردن مواد آلی تراکم باکتری‌های هتروتروف افزایش یافته و فلاک نیز توسعه می‌یابد. Suantika و همکاران (۲۰۱۶)، با بررسی بسترهای مختلف بیان کردند که اگرچه در تمام گروه‌های آزمایشی حذف آمونیوم مشاهده شد، تلقیح باکتری‌های نیتریفیکاسیون باعث افزایش معنی‌دار میزان اکسیداسیون آمونیوم شد و تیمارهای حاوی باکتری‌های نیتریفیکاسیون مقادیر آمونیوم را نسبت به تیمار شاهد به میزان بیشتری کاهش دادند. فلاک‌های میکروبی سبب چرخش دوباره غذاهای باقیمانده و مواد دفعی و استفاده مجدد آن توسط ماهیان شده و باعث می‌شود که جذب غذا بخصوص در شرایط بدون تعویض آب بهتر شود (Xu and Pan, 2012). Andriani و همکاران (۲۰۱۹)، با مطالعه ماهی تیلپیا بیان کردند که نوع فیلتر موجود در سیستم آکوپونیک بر میزان باکتری نیتروزوموناس موجود در آب تأثیر دارد. طاهری نسب و همکاران (۱۴۰۱)، بیان داشتند که ارایه تکنولوژی نسبت بهینه کربن به نیتروژن می‌تواند یک راهکار مناسب برای کنترل پارامترهای کیفی آب و مدیریت مصرف آن باشد.

بطورکلی، سیستم بایوفلاک بر شاخص‌های خونی، ایمنی و نیز کیفی آب مؤثر بود و باعث بهبود شرایط

ماهی در میزان کارایی سیستم بایوفلاک تأثیرگذار می‌باشد. نتایج مطالعات فوق تا حدودی منطبق با نتیجه مطالعه حاضر می‌باشد. بکارگیری سیستم بایوفلاک برای پرورش ماهی مزایایی از قبیل بهبود نرخ رشد (Wasielesky et al., 2006) و کاهش ضریب تبدیل غذایی را به همراه دارد (Burford et al., 2004).

ترکیبات خون تحت تأثیر عوامل فیزیولوژیک و آسیب‌شناسی تغییر می‌کند (جمال‌زاده و همکاران، ۱۳۸۷). مطالعه ترکیبات خونی سبب شناخت وضعیت سلامتی (Bani و Haghi-Vayghan, ۲۰۱۱) و فیزیولوژی آبی (Bistoni و Hued, ۲۰۰۲) می‌شود. شاخص‌هایی نظیر گلبول سفید، گلبول قرمز، هماتوکریت، هموگلوبین، MCHC، MCV و MCH نشان‌دهنده وضعیت سلامتی ماهیان می‌باشد (Michael et al., 2019).

با افزودن مقدار مناسب کربوهیدرات به آب و تنظیم نسبت کربن به ازت، باکتری‌های هتروتروفی مواد غذایی حاصل را جذب و بطور بهینه بایوفلاک تشکیل می‌گردد که در این صورت آمونیاک و نیتريت در آب کاهش می‌یابد (Asaduzzaman et al., 2008). لازم به ذکر است مصرف بیش از حد بایوفلاک باعث برهم خوردن تعادل باکتری‌های هتروتروفی در سیستم پرورش میگو می‌شود (آدینه و هرسیج، ۱۳۹۷). میزان کل مواد جامد معلق شاخص واقعی از توده زیستی یا بایوفلاک می‌باشد (Avnimelech et al., 1994). در سیستم بایوفلاک مدیریت کنترل فلاک بسیار حائز اهمیت است. چرا که تولید بیش از حد فلاک در محیط آبی می‌تواند پاسخ منفی در روند رشد و بازماندگی بوجود آورد (آدینه و هرسیج، ۱۳۹۷). آدینه و هرسیج (۱۳۹۷)، تأثیر سطوح مختلف بایوفلاک بر کیفیت آب،

فیزیولوژیک فیل ماهی جوان گردید. بنابراین، بکارگیری آن در سیستم‌های پرورشی توصیه می‌شود.

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم که از زحمات تمام کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نمایم.

منابع

۱. آدینه، ح. و هرسیج، م.، ۱۳۹۷. تأثیر سطوح مختلف بایوفلاک بر کیفیت آب، عملکرد رشد و بازماندگی پست لارو میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*). مجله تحقیقات دامپزشکی، ۷۳(۴)، ۴۰۱ - ۳۹۳.
۲. بخشی، ف.، ملک زاده ویایه، ر. و حسین نجد گرامی، ا.، ۱۳۹۳. بررسی بازدهی استفاده از سیستم تولید توده زیستی در پرورش متراکم ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). فصلنامه علمی پژوهشی محیط زیست جانوری. سال ششم، ۳، ۵۳-۴۵.
۳. بخشی، ف.، حسین نجد گرامی، ا.، ایمانی، ا. و سروی مغاللو، ک.، ۱۳۹۵. تأثیر استفاده از فناوری بایوفلاک بر پارامترهای رشد، ترکیب لاشه و کاهش هزینه‌های تولید در پرورش متراکم بچه ماهیان کپور معمولی. مجله تحقیقات دامپزشکی. ۷۱(۲)، ۱۶۹-۱۶۲.
۴. جمال‌زاده، ح.، کیوان، آ.، عریان، ش. و قمی مرزدشتی، م.، ۱۳۸۷. بررسی سطوح برخی از شاخص‌های خونی و بیوشیمیایی ماهی آزاد دریای کاسپین (*Salmo trutta caspius*). مجله علمی شیلات ایران. ۱۷(۳)، ۵۴-۴۷.
۵. حق‌پرست رادمرد، م. م.، مجتبی علیشاهی، م.، قربانپور، م. و شهریار، ع.، ۱۳۹۷. بررسی اثر نسبت‌های مختلف کربن-نیتروژن در سیستم پرورش متراکم بایوفلاک بر شاخص‌های رشد و سلامت ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). فصلنامه علمی پژوهشی محیط زیست جانوری. دوره ۱۰ (۲)، ۱۷۰-۱۶۹.
۶. خانجانی، م. ح.، سجادی، م. م.، علی‌زاده، م. و سوری نژاد، ا.، ۱۳۹۴. تأثیر نسبت‌های مختلف غذاهای بر کیفیت آب، عملکرد رشد و بقاء پست لاروهای میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei* Boone 1931) با استفاده از تکنولوژی بایوفلاک. مجله علمی شیلات ایران، ۲۴، ۱۳-۲۷.
۷. خانجانی، م. ح.، سجادی، م. م.، علی‌زاده، م. و سوری نژاد، ا.، ۱۳۹۵. تولید و ارزیابی بایوفلاک به منظور بکارگیری در سیستم‌های بدون تعویض آب. توسعه آبرزی پروری. ۱۰(۱)، ۴۲-۳۳.
۸. خانجانی، م. ح.، ۱۳۹۸. کاربرد فناوری توده ساز زیستی (بایوفلاک) در آبرزی پروری با تأکید بر ماهیان زیستی. آبزیان زینتی. سال ششم، ۲، ۴۸-۳۵.
۹. رضایی توابع، ک. و رفیعی، غ.، ۱۳۹۷. تکثیر و پرورش میگوهای دریایی. چاپ اول. انتشارات دانشگاه تهران. ۲۷۶ ص.
۱۰. شکوری، م.، قلی‌پور، ح. و ناصری، س.، ۱۳۹۲. بررسی سطوح مختلف پودر شفیله کرم ابریشم بر برخی فاکتورهای خونی و بیوشیمیایی بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus*).

17. Ahn, Y., Park, E.J., Oh, Y.K., Park, S., Webster, G. and Andrew, J.W., 2005. Biofilm microbial community of a thermophilic trickling biofilter used for continuous biohydrogen production. *FEMS Microbiology Letter*, 249, 31-38.
18. Andriani, Y., Dhahiyat, Y. and Hasan, Z., 2019. The productivity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and water quality condition in different filters in aquaponics system. *Global Scientific Journals*, 7(6), 591-597.
19. Asaduzzaman, M., Wahab, M.A., Verdegem, M.C.J., Huque, S., Salam, M.A. and Azim, M.E., 2008. C/N ratio control and substrate addition for periphyton development jointly enhance freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* production in ponds. *Aquaculture*, 280, 117-123.
20. Avnimelech, Y., Kochva, M. and Diab, S., 1994. Development of controlled intensive aquaculture systems with a limited water exchange and adjusted carbon to nitrogen ratio. *Aquaculture Bam*, 46(3), 119-131.
21. Avnimelech, Y., 1999. Carbon nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*, 176, 227-235.
22. Avnimelech, Y., 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bioflocs technology ponds. *Aquaculture*, 264, 140-147.
23. Avnimelech, Y., 2009. Biofloc technology: A practical guide book. World Aquaculture Society, Baton Rouge. Louisiana, USA. 182 P.
24. Avnimelech, Y., 2012. Biofloc technology - a practical guide book. 2nd edition, The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, pp. 48, 189.
25. Avnimelech, Y., 2015. Biofloc Technology – A Practical Guide Book. 3rd ed. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States.
26. Bani, A. and Haghi-Vayghan, A., 2011. Temporal variations in haematological and biochemical indices of the Caspian kutum, *Rutilus frisii kutum*. *Ichthyological Research*, 58, 126–133.
27. Emerenciano, M., Ballester, E.L.C., Cavalli, R.O. and Wasielesky, W., 2013. *mykiss*. نشریه توسعه آبی‌پروری. سال هفتم. ۴، ۳۵–۴۲.
۱۱. عامری مهابادی، م.، ۱۳۷۸. روش‌های آزمایشگاهی هماتولوژی دامپزشکی. انتشارات دانشگاه تهران. ۱۲۶ ص.
۱۲. عبدی‌راد، ز. و قائدینا، ب.، ۱۳۹۴. پرورش میگو با سیستم بیوفلاک، فصل‌نامه میگو و سخت‌پوستان، ۱ (۲)، ۱۵–۱۲.
۱۳. صابری، م.، آدینه، ح.، هرسیج، م.، جعفریان، ح. و پاتیمار، ر.، ۱۴۰۱. بررسی هیپوکسی حاد و مزمن بر سیستم ایمنی و آنتی‌اکسیدانی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در سیستم بیوفلاک. نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان. ۱۱ (۲)، ۶۱–۴۹.
۱۴. طاهری‌نسب، ی.م.، کرامت‌امیرکلایی، ع. و اورجی، ح.، ۱۴۰۱. مدیریت پارامترهای کیفی آب استخرهای پرورشی با کمک نسبت بهینه کربن به نیتروژن. نشریه توسعه آبی‌پروری. سال شانزدهم، ۳، ۵۴–۴۵.
۱۵. طرفی، م.، رجب‌زاده، ا. و محمدی‌آذر، ح.، ۱۴۰۱. اثر سیستم بیوفلاک بر شاخص‌های رشد، ترکیب بدن و آنزیم‌های گوارشی ماهی کپور معمولی جوان در تراکم‌های مختلف پرورشی. مجله علمی شیلات ایران. ۳۱ (۱)، ۴۶–۳۱. DOI: 10.22092/ISFJ.2022.126460.
۱۶. کاظمی، ر.، یوسفی‌جوردهی، ا.، پوردهقانی، م.، یارمحمدی، م. و نصیری‌تجن، م.، ۱۳۸۹. فیزیولوژی دستگاه گردش خون آبزیان و فنون کاربردی خونشناسی ماهیان. انتشارات شابک. ۱۹۴ ص.

- rainbow trout. *Aquaculture Research*, 175, 351-363.
36. Sener, E., Yıldız, M. and Savaş, S., 2006. Effect of vegetable protein and oil supplementation on growth performance and body composition of Russian sturgeon juveniles (*Acipenser gueldenstaedtii*) at low temperatures. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 6, 23-27.
 37. Siwicki, A.K. and Anderson, D.P., 1993. Nonspecific defence mechanisms assay in fish. II. Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin (T- Ig) levels in serum. *Fish Diseases Diagnosis and Prevention's Methods*. FAO-Project GCP/INT/526/JPN, IFI Olsztyn. pp: 105-112.
 38. Souza, D.M.D., Suita, S.M., Romano, L.A., Jr, W.W. and Ballester, E.L.C., 2014. Use of molasses as a carbon source during the nursery rearing of *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) in a Biofloc technology system. *Aquaculture Engineering*, 45, 270-277.
 39. Suantika, G., Pratiwi, M.I., Situmorang, M.L., Djohan, Y.A., Muhammad, H. and Astuti, D.I., 2016. Ammonium removal by nitrifying bacteria Biofilm on Limestone and Bioball substrate established in freshwater trickling biofilter. *Poultry, Fisheries and Wildlife Sciences*, 4(2), 157.
 40. Swift, D.J., 1982. Changes in selected blood component values of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, following the blocking of the cortisol stress response with betamethasone and subsequent exposure to phenol or hypoxia. *Journal of Fish Biology*, 21(3), 269-277.
 41. Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M.J., Montero, D., Gines, R., Sweetman, J. and Izquierdo, M.S., 2011. Improved feed utilization, intestinal mucus production and immune parameters in Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides (MOS). *Aquaculture Nutrition*, 17(2), 223-233.
 42. Wasielesky Jr, W., Atwood, H., Stokes, A., Browdy, C.L., 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture Effect of biofloc technology (BFT) on the early postlarval stage of pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*: growth performance, floc composition and salinity stress tolerance. *Aquaculture international*, 19, 891-901.
 28. Ju, Z.Y., Forster, I., Conquest, L. and Dominy, W., 2008. Enhanced growth effects on shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from inclusion of whole shrimp floc or floc fractions to a formulated diet. *Aquaculture Nutrition*, 14, 533-543.
 29. Kamilya, D., Debbarma, M., Pal, P., Kheti, B., Sarkar, S. and Singh, S.T., 2017. Biofloc technology application in indoor culture of *Labeo rohita* (Hamilton, 1822) fingerlings: The effects on inorganic nitrogen control, growth and immunity. *Chemosphere*, 182, 8-14.
 30. Khoshbavar Rostami, H.A., Soltani, M. Mohd Daud, H.H., 2006. Immune response of great sturgeon (*Huso huso*) subjected to long-term exposure to sublethal concentration of the organophosphate, diazinon. *Aquaculture*, 256(1-4), 88-94.
 31. Klontz, G.W., 1994. Fish Hematology. In *Techniques in Fish Immunology*. Edited by JS Stolen.; TC Fletcher., A.F Rowley., T.C Kelikoff., S.L. Kaattari and S.A. Smith. SOS Publications. P, 121-132.
 32. Long, L., Jing Yang, J., Yuan Li, Y., Chongwu Guan, C. and Fan Wu, F., 2015. Effect of biofloc technology on growth, digestive enzyme activity, hematology, and immune response of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 448, 135-141.
 33. Mahanand, S. S., Moulick, S. and Srinivasa Rao, P., 2013. Water Quality and Growth of Rohu, *Labeo rohita*, in a Biofloc System. *Journal of Applied Aquaculture*, 25, 121-131.
 34. Michael, S. E., Abarike, E. D. and Cai, J., 2019. A Review on the Probiotic Effects on Haematological Parameters in Fish. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, 6(1), 32-38.
 35. Pottinger, T.G. and Carrick, T.R., 2001. A comparison of plasma glucose and plasma cortisol as selection markers for high and low stress-responsiveness in female

- system for white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture, 258(1-4), 396-403.
43. Xu, W.J. and Pan, L.Q., 2012a. Effects of bioflocs on growth performance, digestive enzyme activity and body composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* in zero-water exchange tanks manipulating C/N ratio in feed. Aquaculture, 356-357, 147-152.
44. Xu, W.J., Pan, L.Q. and Zhao, D.H., 2012b. Preliminary investigation into the contribution of bioflocs on protein nutrition of *Litopenaeus vannamei* fed with different dietary protein levels in zero-water exchange culture tanks. Aquaculture. 350–353, 147–153.
45. Yousefi Jourdehi, A., Sudagar, M., Bahmani, M., Hoseini, S.A., Dehghani, M.A. and Yazdani, M.A., 2014. Comparative study of dietary soy phytoestrogens genistein and equol effects on growth parameters and ovarian development in farmed female beluga sturgeon, *Huso huso*. Fish Physiology and Biochemistry, 40(1), 117-128.